Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. W. Schwerd

UNTERSUCHUNGEN ZUR DARSTELLUNG DER HAPTOGLOBINTYPEN AUS BLUTSPUREN

INAUGURAL-DISSERTATION

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Roman Staudinger
aus Passau

Würzburg, den 1. Mai 1981

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. W. Schwerd

UNTERSUCHUNGEN ZUR DARSTELLUNG DER HAPTOGLOBINTYPEN AUS BLUTSPUREN

INAUGURAL-DISSERTATION

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Roman Staudinger
aus Passau

Würzburg, den 1. Mai 1981

Referent: Prof. Dr. W. Schwerd
Korreferent: Prof. Dr. E. Schulz
Dekan: Prof. Dr. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 6.7.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

I. LITERARISCHER TEIL

1. Einleitung 1
2. Die Bedeutung der Haptoglobine in der Rechtsmedizin 1
3. Methoden zur Haptoglobindarstellung aus Blutspuren 2
   a. Stärkegelelektrophorese 2
   b. PAA-Gel-Elektrophorese 3
   c. Immunelektrophorese 3
   d. Disk-Elektrophorese 3

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. PAA-Gel-Elektrophorese 5
   1. Material und Methodik 5
      a. Herstellung und Aufbewahrung der Blutspuren 5
      b. Aufbereitung der Blutspuren 5
      c. Herstellung des PAA-Gels 6
      d. Herstellung des Brücken- und Gelpuffers 7
      e. Durchführung der PAA-Gel-Elektrophorese 7
   2. Ergebnisse 7
      a. Anwendung der Gefriertrocknung 8
      b. Unterschiede in der Darstellbarkeit der Hp-Typen 9
      c. Dauer der Nachweisbarkeit 9
      d. Wirkung der Säulenchromatographie auf die Hb-Konzentration im Eluat 9

B. Immunelektrophorese 15
   1. Material und Methodik 15
      a. Herstellung und Aufbewahrung der Blutspuren 15
      b. Aufbereitung der Blutspuren 15
      c. Puffer 15
      d. Antiseren 16
      e. Durchführung der Immunelektrophorese 16

2. Ergebnisse 17
a. Elutionsdauer und Dauer der Nachweisbarkeit der einzelnen Hp-Typen 17
b. Einfluß des Antiserums auf die Darstellbarkeit 18
c. Anwendung der Gefriertrocknung 18

C. Disk-Elektrophorese 24
1. Material und Methodik 24
a. Herstellung und Aufbewahrung der Blutspuren 24
b. Aufbereitung der Blutspuren 24
c. Herstellung der Gele und Puffer 25
d. Durchführung der Disk-Elektrophorese 27
2. Ergebnisse 27
a. Alleinige Anwendung der Disk-Elektrophorese 27
b. Anwendung der Säulenchromatographie vor der Disk-Elektrophorese 28
c. Anwendung der Säulenchromatographie und der Gefriertrocknung vor der Disk-Elektrophorese 28
d. Anwendung der Gefriertrocknung vor der Disk-Elektrophorese 29

III. DISKUSSION 32

IV. ZUSAMMENFASSUNG 37

Literaturverzeichnis I - VII

I. LITERARISCHER TEIL

1. Einleitung

Die Haptoglobine sind im Serum vorkommende Eiweißstoffe, die zu den α_2-Glykoproteinen gehören.

1938 entdeckten POLONOWSKI und JAYLE bei Untersuchungen über die Peroxydaseaktivität des Hämoglobins Proteine, die freies Hämoglobin binden können. Sie gaben ihnen den Namen "Haptoglobine" (haptein = haften).

Im Jahr 1955 wurden von SMITHIES in der Stärkegelelektrophorese drei verschiedene Hp-Typen dargestellt. Ihr Erbgang wurde von SMITHIES und WALKER beschrieben. Den Phänotypen Hp 1-1, Hp 2-1 und Hp 2-2 liegen zwei allele autosomale Gene zugrunde, nämlich Hp^1 und Hp^2. Sie werden kodominant vererbt.

Es gibt viele Untersuchungen über die Häufigkeit der Haptoglobintypen in verschiedenen Ländern und bei verschiedenen Rassen. Nach PROKOP und GÖHLER liegt in Berlin folgende Phänotypenfrequenz vor:

Hp 1-1	14 %
Hp 2-1	47 %
Hp 2-2	39 %

2. Die Bedeutung der Haptoglobine in der Rechtsmedizin

Die Haptoglobine haben auf zwei Gebieten der Rechtsmedizin Bedeutung erlangt, nämlich bei der Vaterschaftsbegutachtung und in der Blutspurenkunde.

Bei der ersteren liegen technisch optimale Bedingungen vor, denn es wird Serum elektrophoretisch aufgetrennt. Darin findet sich aber meist, von wenigen Ausnahmen abgesehen, eine ausreichende Haptoglobinkonzentration, und es kann genau die zur Darstellung erforderliche Menge frischen Hämoglobins zugegeben werden.

Anders gestalten sich die Verhältnisse bei der Untersuchung von Blutspuren.
Zum einen ist die Haptoglobinkonzentration niedriger; zum anderen besteht ein reichlicher Überschuß an freiem Hämoglobin in Blutspurenauszügen. Dieser Überschuß führt zu Hämoglobinschleppen, unter denen die Haptoglobinbanden nicht mehr oder nur schlecht erkennbar sind. Die dritte Schwierigkeit entsteht durch die relativ kurze Zeitdauer, in der die Haptoglobine nachweisbar sind. Diese wird in der Literatur mit maximal 4 Monaten angegeben.

Es wurden zahlreiche Verfahren entwickelt, um auch unter den erschwerten Bedingungen der Blutspurenuntersuchung die Hp-Typen differenzieren zu können.

3. Methoden zur Haptoglobintypendarstellung aus Blutspuren

a. Stärkegelelektrophorese

Methoden zur Haptoglobintypendifferenzierung im Stärkegel wurden von DÜRWALD, VOGEL, FALK und BUNDSCHUH, CULLIFORD, HEIFER und MÜNSCHER beschrieben.
Die Zeitdauer der Nachweisbarkeit schwankt bei den verschiedenen Autoren zwischen 1-2 Tagen und 3 Monaten. Allen Verfahren gemeinsam ist, daß die Ausbildung von Hämoglobinschleppen nicht vermieden werden kann.
Die Stärkegelelektrophorese ist bei Blutspurenuntersuchungen in den Hintergrund getreten, ihr Hauptanwendungsgebiet ist die Paternitätsserologie.

b. PAA-Gel-Elektrophorese

Die PAA-Gel-Elektrophorese hat gegenüber dem Stärkegel den Vorteil der Durchsichtigkeit des Trägermaterials.

GERVAIS und VIESCOU gelang die Hp-Differenzierung in bis zu 15 Tage alten Blutflecken.
SCHAIBLE konnte an bis zu 16 Tage alten Proben in Gelröhrchen zwar Haptoglobinbanden nachweisen, eine Unterscheidung der Typen 2-1 und 2-2 war jedoch nicht möglich.
FELIX, BOENISCH und GIESE konnten mit ihrer Modifikation noch einen Monat alte Spuren nachweisen.

c. Immunelektrophorese

HIRSCHFELD beschrieb als erster die in der Immunelektrophorese aus Serum dargestellten Haptoglobinpräzipitate.
HALLERMANN und STÜRNER untersuchten 1962 als erste Blutspuren mit Hilfe der Immunelektrophorese unter Verwendung von Neugeborenenserum.
CULLIFORD und WRAXALL konnten Spuren bis zu einem Alter von 3 Monaten differenzieren, BARGAGNA und BONDI bis zu 9 Wochen, WHITEHEAD und MORRIS bis zu 3 Wochen; STALLBAUM erhielt nach 9 - 10 Wochen noch 50 % richtige Ergebnisse.
HILGERMANN konnte Spuren bis maximal 8 - 14 Tage darstellen, FUKAE et al. bis zu 20 - 30 Tagen.

d. Disk-Elektrophorese

Die Disk-Elektrophorese wurde 1964 von ORNSTEIN und DAVIS beschrieben.
Versuche zur Hp-Diagnostik mit der Disk-Elektrophorese wurden von GONZALO et al. und von HILGERMANN veröffentlicht.
Die Haptoglobintypen konnten bis zu 4 Wochen bestimmt werden.
BAXTER und REES konnten mit einer Modifikation bis zu 4 Monate alte Spuren erkennen.

Weitere Versuche wurden unternommen, um das überschüssige Hämoglobin schon vor der Elektrophorese zu eliminieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde von dem Verfahren von OYA und TAKABE ausgegangen.
Sie tropften Frischblut in Mengen von 0,05 - 0,1 ml auf Filterpapier auf und extrahierten die Blutspuren mit 1,0 ml 0,01 m Phosphatpuffer (pH 6,0). Der pH-Wert des Extrakts betrug 6,5 - 6,6. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 3000 upm wurde der Blutextrakt (ca. 0,7 ml) auf eine kleine, mit P-Cellulose gefüllte Säule (5 x 20 mm) aufgetragen. Diese wurde vorher mit 0,01 m Phosphatpuffer (pH 6,6) äquilibriert. Die Elution des Extraktes erfolgte mit demselben Puffer, das Eluat wurde in Fraktionen von 0,5 ml aufgefangen. Zur Elektrophorese wurden etwa 0,1 ml vom entfärbten Eluat verwendet.
Mit dieser Methode konnte eine einwandfreie Haptoglobintypisierung noch aus 1 Monat alten Spuren erreicht werden.

SAGISAKA und SHIMADA verwendeten CM Sephadex 50. Sie gaben den Blutspurenextrakt auf eine 0,5 x 10 cm messende Säule auf. Die Elution erfolgte zunächst mit 0,01 m Phosphatpuffer (pH ca. 6,0), dann mit 0,1 m Phosphatpuffer (pH 7,4) mit 0,1 m NaCl.
Die Verfasser konnten bis zu 1 Monat alte Blutspuren bestimmen.
Sephadex G 200 kann laut SAGISAKA und SHIMADA zwar das Hämoglobin vom Hb-Hp-Komplex trennen, es kann aber zu einer falschen Hp-Typen-Differenzierung in der Elektrophorese führen.

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. PAA-Gel-Elektrophorese

1. Material und Methodik

a. Herstellung und Aufbewahrung der Blutspuren

Frischblut wurde in Mengen von 0,1 ml auf Filterpapier und Glasplatten aufgebracht. Die Blute stammten von Spendern der Typen 1-1, 2-1 und 2-2. Die Spuren wurden bei Raumtemperatur gelagert.

b. Aufbereitung der Blutspuren

α. Glas:
Blutspuren auf Glas wurden abgekratzt, in ein Reagenzglas gegeben und mit 0,5 - 1,0 ml 0,01 m Phosphatpuffer (pH 6,0) in Lösung gebracht.

β. Papier:
Blutspuren auf Papier wurden in der fünffachen Menge des Frischblutausgangsvolumens bei 4 °C in Lösung gebracht. Die Elutionsdauer betrug in der Regel 6 Stunden. Nach Beendigung der Elution wurde das Papier aus dem Extrakt entfernt und noch enthaltene Flüssigkeit, soweit möglich, abgepreßt.

Der Extrakt wurde über eine 7 x 0,5 cm messende, mit phosphorylierter Cellulose (Servacel Nr. 45130 der Firma Serva) gefüllte Säule laufen gelassen. Die Cellulose wurde vorher in 0,01 m Phosphatpuffer (pH 6,6) eingebracht. Die Elution erfolgte mit demselben Puffer. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 5 Tropfen pro 2 Minuten. Das Eluat wurde in einer einzigen Portion in einem Reagenzglas aufgefangen.
Bei einem Teil der Versuche wurde das Eluat für mindestens 1 Stunde auf - 60 °C eingefroren.

Daran schloß sich die vollständige Gefriertrocknung in einem Leybold-Heraeus-Gefriertrockner Typ GT 2 an. Nach Beendigung der Gefriertrocknung wurden einige Tropfen Aqua dest. zugegeben, bis die Lösung eine klare, hellbräunliche Farbe zeigte.
Bei einem anderen Teil der Versuche wurde das Eluat nach der Säulenpassage nicht eingefroren und gefriergetrocknet, sondern gleich der Elektrophorese unterworfen.

c. Herstellung des PAA-Gels (nach WALCHER)

Es wurde PAA-Gel mit 5 % Acrylamid verwendet. Für 10 PAA-Gele wurde folgender Ansatz hergestellt:

Lösung I:	Acrylamid	80,0 g
	BIS	3,2 g
	Aqua dest. ad	400 ml
Lösung II:	DMAPN	6,4 ml
	Aqua dest. ad	400 ml
Lösung III:	Kaliumferricyanid	0,15 g
	Aqua dest. ad	500 ml
Lösung IV:	APOS	1,92 g
	Aqua dest. ad	400 ml

Die Lösungen I-IV wurden in der angegebenen Reihenfolge zusammengeschüttet. Die Polymerisation wurde 2 Stunden lang in 200 x 100 x 4 mm messenden Kammern unter einer Neonleuchte durchgeführt. Anschließend erfolgte dreitägiges Waschen in 2 : 1 verdünntem Gelpuffer in einem mit einer Umwälzpumpe versehenen Behälter.

d. Herstellung des Brücken- und Gelpuffers

Brückenpuffer:	H_3BO_3 (krist. Borsäure)	55,6 g
	NaOH (Plättchenform Merck)	12,0 g
	Aqua bidest. ad 4,0 l	
Gelpuffer:	Tris	13,64 g
	Zitronensäure	2,40 g
	Aqua bidest. ad 4,0 l	

e. Durchführung der PAA-Gel-Elektrophorese

3 cm vom unteren Gelrand entfernt wurden mit einem Skalpell kleine Schlitze geschnitten. In diese wurden 4 x 4 mm messende Filterpapierstückchen (Schleicher & Schüll Nr. 598), die in das Eluat getaucht und anschließend kurz abgetrocknet worden waren, gesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 24 mA durchgeführt, die Spannung betrug 160 V (sie mußte während der Elektrophorese nachgestellt werden). Die Laufzeit betrug 105 - 120 Minuten.

Folgendes Färbegemisch wurde verwendet:

o-Tolidin	1 g
Eisessig	50 ml
Aqua dest.	50 ml
Perhydrol	1 ml

Ein Stück Filterpapier wurde in die Färbelösung getaucht und dann auf das Gel gelegt. Überschüssige Färbelösung wurde abgesaugt und die Ergebnisse über einem Lichtkasten abgelesen.

2. Ergebnisse

Es wurden insgesamt 42 Gele mit 558 Einzelproben untersucht.

Die Haptoglobintypen wurden entweder mit Serum überprüft oder waren bekannt. Die Elutionszeit der auf Papier aufgebrachten Spuren betrug in der Regel 6 Stunden, eine Verlängerung auf 12 Stunden lieferte keine besseren Ergebnisse.

Es wurden Versuche mit unterschiedlich langen Säulen durchgeführt, und zwar in den Längen 2, 3, 5 und 7 cm.

Bei Säulen mit einer Länge von 2 bzw. 3 cm konnte die säulenchromatographische Abtrennung des überschüssigen Hämoglobins vom Haptoglobin in keiner Weise zufriedenstellen. Es zeigten sich in der PAA-Gel-Elektrophorese stark ausgeprägte Hämoglobinschleppen, in denen keine Haptoglobinbanden erkennbar waren. Am wirkungsvollsten erwies sich eine Säulenlänge von 7 cm. Mit noch längeren Säulen konnte zwar ein sehr hämoglobinarmes Eluat erzielt werden, jedoch waren dann die Haptoglobintypen wegen offensichtlich zu geringer Konzentration im Eluat in der PAA-Gel-Elektrophorese nicht zu ermitteln. Außerdem traten Laufunregelmäßigkeiten bei der Säulenpassage ein.

a. Anwendung der Gefriertrocknung

In einer anderen Versuchsreihe wurde das Eluat nach der Säulenchromatographie gefriergetrocknet, mit wenigen Tropfen Aqua dest. wieder aufgelöst und dann der PAA-Gel-Elektrophorese unterworfen.

Diese Verfahrensweise lieferte zum Teil hervorragend klare Bilder, die an die Qualität von Serumelektrophoresen heranreichen. Der Nachteil dieser Methode ist, daß schon bei geringfügig zu hoher Hämoglobinkonzentration im Eluat durch die Gefriertrocknung so hohe Hämoglobinkonzentrationen in der Elektrophorese erreicht wurden, daß eine Hämoglobinschleppe auftrat, die die Hp-Typen nicht mehr erkennen ließ. Versuchte man dies zu vermeiden, indem man entweder die Säulenfüllung verlängerte oder weniger Blutspurenmaterial nahm, trat die Gefahr auf, auch eine zu niedrige Haptoglobinkonzentration

und somit keine oder nur ungenügend erkennbare Banden in der Elektrophorese zu erhalten.

Als optimale Ausgangsmenge für Blutspuren sind 0,15 - 0,20 ml Frischblut zu betrachten. Mit weniger als 0,15 ml Frischblut ist in der Regel kein Hp-Nachweis möglich. Größere Spurenmengen führen zur Ausbildung von Hämoglobinschleppen und beeinträchtigen dadurch den Hp-Nachweis.

Spuren auf Glas ließen sich im PAA-Gel nicht wesentlich besser nachweisen als solche auf Papier.

b. Unterschiede in der Darstellbarkeit der Hp-Typen

Am besten ließen sich die Typen 1-1 und 2-1 darstellen. Weitaus schlechter war die Darstellbarkeit des Typs 2-2. Er ließ sich nur aus frischen Spuren nachweisen.

c. Dauer der Nachweisbarkeit

Sowohl mit als auch ohne Gefriertrocknung ließen sich Spuren bis zu einem Alter von maximal 1 Woche nachweisen. Bei älteren Spuren zeigten sich keine Banden mehr.

d. Wirkung der Säulenchromatographie auf die Hb-Konzentration im Eluat

Vorversuche zur Bestimmung der Hp-Typen aus Blutspurenextrakten ohne vorherige säulenchromatographische Abtrennung des überschüssigen Hämoglobins lieferten keine verwertbaren Ergebnisse, da unter den Hämoglobinschleppen keine Hp-Banden erkennbar waren.

Den Effekt der Säulenchromatographie mögen folgende zwei spektrophotometrische Kurven verdeutlichen:

In Abb. 1 handelt es sich um eine Blutspur mit einem Frischblut-Ausgangsvolumen von 0,20 ml. Die Elution erfolgte mit 1,0 ml Phosphatpuffer. Zur Spektrophotometrie wurde das Eluat 1 : 400 verdünnt.
In Abb. 2 liegt die gleiche Blutspur in derselben Verdünnung wie in Abb. 1 vor, jedoch wurde das Eluat über eine 7 x 0,5 cm messende Säule laufen gelassen.

Bei 280 nm wurde der Gesamt-Protein-Gehalt des Eluats bestimmt (RICHTERICH). Die Werte vor und nach Säulenpassage sind identisch.

Das Hämoglobin wurde bei 410 nm spektrophotometriert. Hier zeigt sich ein deutlich erniedrigter Hb-Wert nach der Säulenchromatographie.

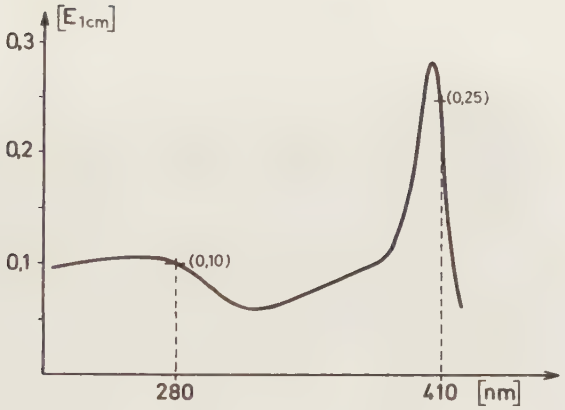

Abb. 1: 0,2 ml Ausgangsvolumen der Blutspur, Elution mit 1,0 ml Puffer. Zur Spektrophotometrie Verdünnung des Eluats 1 : 400.

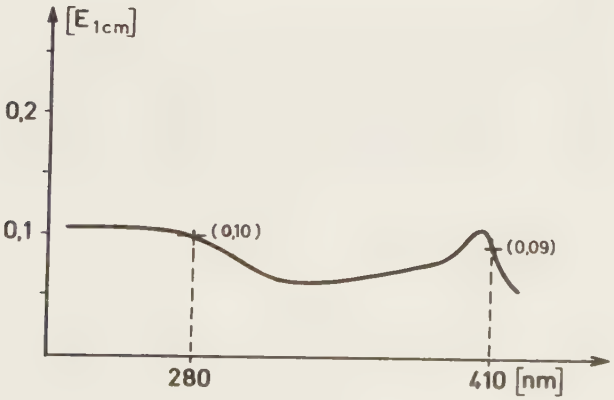

Abb. 2: Gleiche Blutspur und Verdünnung wie in Abb. 1, jedoch Passage des Eluats über eine 7 x 0,5 cm messende Säule.

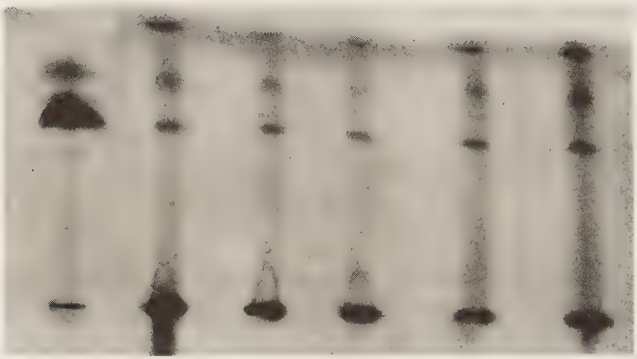

Abb. 3: Typ 1-1

Nr. 1 = Serum

Nr. 2-5 = Passage der Blutspur über eine 7 x 0,5 cm messende Säule; keine Gefriertrocknung.

Nr. 6 = Passage der Blutspur über eine 7 x 0,5 cm messende Säule; mit Gefriertrocknung.

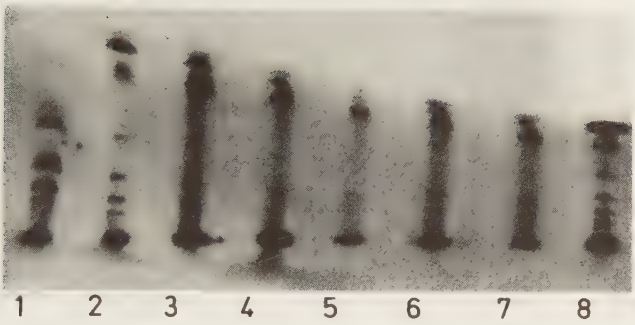

Abb. 4: Typ 2-1

Nr. 1 = Serum

Nr. 2 = Passage der Blutspur über eine 7 x 0,5 cm messende Säule; mit Gefriertrocknung.

Nr. 3-7 = Passage der Blutspur über eine 7 x 0,5 cm messende Säule; ohne Gefriertrocknung.

Nr. 8 = Passage der Blutspur über eine 7 x 0,5 cm messende Säule; mit Gefriertrocknung.

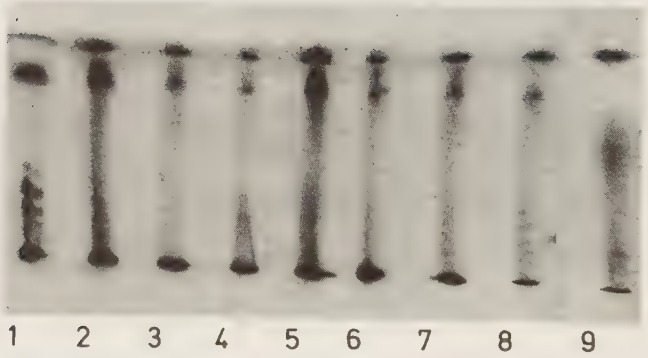

Abb. 5: Typ 2-2

Nr. 1 = Serum

Nr. 2-8 = Passage der Blutspur über eine 7 x 0,5 cm messende Säule; keine Gefriertrocknung.

Nr. 9 = Passage der Blutspur über eine 7 x 0,5 cm messende Säule; mit Gefriertrocknung.

B. Immunelektrophorese

1. Material und Methodik

a. Herstellung und Aufbewahrung der Blutspuren

Das Vorgehen entsprach dem bei der PAA-Gel-Elektrophorese beschriebenen Verfahren.

b. Aufbereitung der Blutspuren

α. Glas:
Blutspuren auf Glas wurden abgekratzt, in ein Reagenzglas gegeben und mit wenigen Tropfen Gelpuffer in Lösung gebracht.

ß. Papier:
Blutspuren auf Papier wurden mit der drei- bis fünffachen Menge des Frischblut-Ausgangsvolumens an Gelpuffer bei 4 °C in Lösung gebracht. Die Elutionsdauer betrug in der Regel 6 Stunden. Nach Beendigung der Elution wurde das Papier aus dem Extrakt entfernt und noch enthaltene Flüssigkeit, soweit möglich, abgepreßt. Der Extrakt wurde mindestens 1 Stunde lang auf - 60 °C eingefroren. Anschließend erfolgte die vollständige Gefriertrocknung. Nach Beendigung der Gefriertrocknung wurden 1 - 3 Tropfen Aqua dest. zu dem getrockneten Extrakt gegeben.

c. Puffer

Gelpuffer:

Kombiniertes Puffersystem (pH 10,0):

Herstellung:
Veronalpuffer nach HIRSCHFELD (pH 8,7):
Veronal 8,3 g

Veronal-Natrium 52,50 g
Kalziumlaktat 7,68 g
Aqua dest. ad 5,0 l

Glykokoll-NaOH-Puffer nach SÖRENSEN (pH 10,8):
Lösung I: Glykokoll 7,505 g
NaCl 5,850 g
Aqua dest. ad 1,0 l
Lösung II: 0,1 n NaOH
Lösung I : II = 52,5 : 47,5 vermischen und mit der doppelten Menge Aqua dest. verdünnen.

HIRSCHFELD-Puffer : SÖRENSEN-Puffer = 20 : 35 vermischen.

Brückenpuffer:

Veronalpuffer nach HIRSCHFELD (pH 8,7):
Veronal 6,60 g
Veronal-Natrium 43,80 g
Kalziumlaktat 1,92 g
Aqua dest. ad 5,0 l

d. Antiseren

Folgende Antiseren wurden verwendet:
Anti-Haptoglobin-Serum 2 : 1 gemischt mit Anti-α_2-Makroglobulin-Serum der Behring-Werke; außerdem Anti-Haptoglobin/Anti-α_2-Makroglobulin-Serum (fertig gemischt) der Firmen Fresenius und Gödecke.

e. Durchführung der Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese wurde auf 76 x 25 mm messenden Objektträgern in 2 %igem Agargel durchgeführt. Für etwa 10 Objektträger wurden verwendet:
Agar purum 0,8 g
Aqua dest. 26,7 ml
Gelpuffer 13,3 ml

Von dieser Lösung wurden 3 ml auf jeden Objektträger pipettiert. In den erstarrten Agar wurden der Mittelgraben und die Startlöcher eingestanzt und die letzteren beimpft. Die anschließende Auftrennung wurde mit 50 V bei 30 mA Stromstärke durchgeführt. Die Elektrophoresedauer betrug 3 - 4 Stunden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde der Mittelkanal herausgelöst und das Antiserum zugegeben. Die Objektträger wurden in einer feuchten Kammer in den Brutschrank gestellt und dort über Nacht (mindestens 15 Stunden) bei 37 °C belassen. Die Ergebnisse wurden über einem Lichtkasten abgelesen.

2. Ergebnisse

Es wurden 131 Spurenuntersuchungen mit der Immunelektrophorese durchgeführt. Die Hp-Typen wurden entweder mit frischen Seren überprüft oder waren bekannt.

Die Form und die Lage der Präzipitatlinien bei der Verwendung von Blutspurenaufschwemmungen wurden von BRINKMANN und STALLBAUM beschrieben.

a. Elutionsdauer und Dauer der Nachweisbarkeit der einzelnen Hp-Typen

Die auf Papier aufgebrachten Blutspuren wurden 6 Stunden eluiert. Eine Verlängerung der Elutionsdauer auf 12 Stunden und 15 Stunden brachte keine besseren Ergebnisse. Eine Verkürzung der Elutionsdauer auf 3 Stunden war bei frischen Spuren möglich, bei über 1 Woche alten Proben lieferte die sechsstündige Elutionszeit kräftigere Präzipitatlinien.

Spuren, die auf Glasplatten angelegt worden waren, zeigten eine bessere Darstellbarkeit. Sie ließen sich nach 3 Wochen noch mit ausreichender Sicherheit ablesen; Spuren auf Papier hingegen erreichten nach 2 Wochen die Grenze ihrer Identifi-

zierbarkeit. Nach 4 Wochen waren auch die auf Glas aufgebrachten Spuren nicht mehr erkennbar. Auf die unterschiedliche Ablesbarkeit der einzelnen Hp-Typen wurde bereits oben hingewiesen.

Spurenalter	Trägermaterial	
	Glas	Papier
1 Woche	alle Typen darstellbar	alle Typen darstellbar
2 Wochen	alle Typen darstellbar	1-1 und 2-1 darstellbar, 2-2 nicht mehr zu identifizieren
3 Wochen	1-1 und 2-1 darstellbar, 2-2 nicht mehr sicher erkennbar	keine Darstellbarkeit
4 Wochen	keine Darstellbarkeit	keine Darstellbarkeit

b. Einfluß der Antiseren auf die Darstellbarkeit

Die Darstellbarkeit war am besten mit Antiseren der Firmen Gödecke und Fresenius. Beide Antiseren sind vom Hersteller mit einem Anti-α_2-Makroglobulin-Serum gemischt. Weniger gut war die Darstellbarkeit der Präzipitate des Anti-Hp-Serums der Behring-Werke. Es muß vor Gebrauch mit einem Anti-α_2-Makroglobulin-Serum im Verhältnis 2 : 1 gemischt werden.

c. Anwendung der Gefriertrocknung

Um eine vollständige Gefriertrocknung zu erreichen, und um eine Entmischung des Hp's zu verhindern, wurden die Eluate auf - 60 °C eingefroren.

Aus nicht eingeengten Extrakten ließ sich der Hp-Typ zwar darstellen, die Präzipitationslinien waren jedoch relativ schwach. Die Gefriertrocknung ermöglichte eine wesentlich bessere Darstellbarkeit. Die Präzipitatlinien aus eingeengten Extrakten waren intensiver. Blutspuren konnten mit reichlich Flüssigkeit extrahiert werden, da durch die anschließende Einengung eine genügend hohe Hp-Konzentration erreicht wurde. Eine Schädigung des Haptoglobins durch Einfrieren und Gefriertrocknung ließ sich nicht feststellen. Eine mehrtägige Lagerung in eingefrorenem Zustand wurde überstanden, ohne daß die Darstellbarkeit vermindert gewesen wäre.

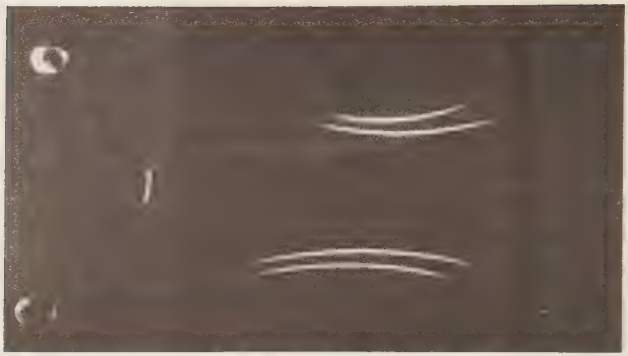

Abb. 6: Oben: 1-1, Spur auf Glas, 5 Tage alt.
Unten: 1-1, Serum.

Abb. 7: Oben: 2-1, Spur auf Glas, 5 Tage alt.
Unten: 1-1, Serum.

Abb. 8: Oben: 2-2, Spur auf Glas, 5 Tage alt.
Unten: 1-1, Serum.

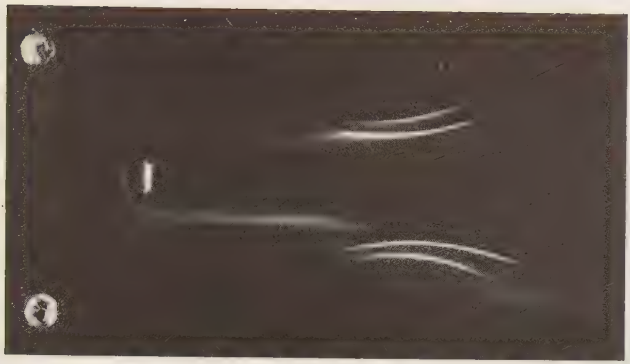

Abb. 9: Oben: 1-1, Spur auf Papier, 5 Tage alt.
Unten: 1-1, Spur auf Glas, 5 Tage alt.

Abb. 10: Oben: 2-1, Spur auf Papier, 5 Tage alt.
Unten: 2-1, Spur auf Glas, 5 Tage alt.

Abb. 11: Oben: 2-2, Spur auf Papier, 5 Tage alt.
Unten: 2-2, Spur auf Glas, 5 Tage alt.

Abb. 12: Oben: 1-1, Spur auf Papier, 15 Tage alt.
Unten: 1-1, Spur auf Glas, 15 Tage alt.

Abb. 13: Oben: 2-1, Spur auf Papier, 15 Tage alt.
Unten: 2-1, Spur auf Glas, 15 Tage alt.

Abb. 14: Oben: 2-2, Spur auf Papier, 15 Tage alt.
Unten: 2-2, Spur auf Glas, 15 Tage alt.

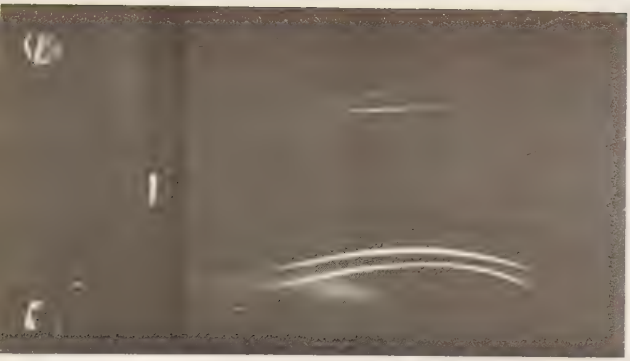

Abb. 15: Oben: 1-1, Spur auf Glas, 22 Tage alt.
Unten: 1-1, Serum.

Abb. 16: Oben: 2-1, Spur auf Glas, 22 Tage alt.
Unten: 1-1, Serum.

Abb. 17: Oben: 2-2, Spur auf Glas, 22 Tage alt.
Unten: 2-1, Serum.

C. Disk-Elektrophorese

1. Material und Methodik

a. Herstellung und Aufbewahrung der Blutspuren

Das Vorgehen entsprach dem bei der PAA-Gel-Elektrophorese beschriebenen Verfahren.

b. Aufbereitung der Blutspuren

α. Glas:
Blutspuren auf Glas wurden abgekratzt, in ein Reagenzglas gegeben und mit wenigen Tropfen 0,04 %iger NH_3-Lösung oder 0,01 m Phosphatpuffer in Lösung gebracht.

β. Papier:
Blutspuren auf Papier wurden mit 0,04 %iger NH_3-Lösung oder mit 0,01 m Phosphatpuffer 12 Stunden lang bei 4 °C und anschließend 2 Stunden lang bei Zimmertemperatur eluiert. Es wurde nach 4 verschiedenen Verfahrensweisen vorgegangen:

1. Die Spur wurde mit möglichst wenig Elutionsmittel (wenige Tropfen) gelöst. Vom Überstand wurden mit einer Kapillare einige Tropfen zur Elektrophorese entnommen.

2. Die Spur wurde in der drei- bis fünffachen Menge des Frischblut-Ausgangsvolumens an 0,01 m Phosphatpuffer (pH 6,0) gelöst. Anschließend wurde das Eluat über eine 2 bzw. 3 x 0,5 cm messende, mit phosphorylierter Cellulose gefüllte Chromatographiesäule laufen gelassen. Die P-Cellulose wurde vorher in 0,01 m Phosphatpuffer eingebracht. Die Elution der Säule erfolgte mit demselben Puffer. Die ersten Tropfen des Eluats wurden verworfen, von dem folgenden, intensiv rötlich-bräunlich gefärbten Eluat wurden einige Tropfen aufgefangen und der Disk-Elektrophorese zugeführt.

3. Zunächst wurde wie unter 2. geschildert vorgegangen. Abweichend davon wurde das gesamte rötlich-bräunlich gefärbte Eluat in einer Portion aufgefangen. Es wurde 1 Stunde lang auf - 60 °C gefroren. Daran schloß sich die Gefriertrocknung an. Vor der Disk-Elektrophorese wurde das Lyophilisat mit wenigen Tropfen Aqua dest. gelöst.

4. Die Spur wurde in 0,01 m Phosphatpuffer (fünffache Menge des Frischblutausgangsvolumens) gelöst. Der Extrakt wurde eingefroren, gefriergetrocknet, in wenigen Tropfen Aqua dest. gelöst und diskelektrophoretisch aufgetrennt.

c. Herstellung der Gele und Puffer

Die Disk-Elektrophorese wurde nach der von HILGERMANNN angegebenen Methode durchgeführt.

Grundreagenzien:

Acrylamid (AA), Merck; NN-Methylenbisacrylamid (BIS), Merck; NNNN-Tetramethyläthylendiamin (TEMED), Serva; Ammoniumperoxodisulfat (APOS), Merck; Riboflavin, Merck; Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), Merck; Glykokoll, Merck.

Stammlösungen:

Trenngel-Puffer (pH 8,9):

1 n HCl	48,00 ml
TRIS	5,98 g
TEMED	0,23 ml
Aqua bidest.	ad 100,0 ml

Probengel-Puffer (pH 6,7):

1 n HCl	52,00 ml
TRIS	5,98 g
TEMED	0,46 ml
Aqua bidest.	ad 100,0 ml

Trenngel-Monomer-Gemisch:

AA	30,0 g
BIS	0,8 g
Aqua bidest. ad	100,0 ml

Probengel-Monomer-Gemisch:

AA	10,0 g
BIS	2,5 g
Aqua bidest. ad	100,0 ml

Katalysator:

APOS	0,14 g
Aqua bidest. ad	100,0 ml

Photokatalysator:

Riboflavin	0,008 g
Aqua bidest. ad	100,0 ml

Elektrodenpuffer:

TRIS-Glycin-Puffer (pH 8,5):

TRIS	30,0 g
Glykokoll	144,0 g
Aqua bidest. ad	1,0 l

Vor Gebrauch 1 : 10 zu verdünnen

Gebrauchslösungen:

Trenngel-Lösung (Gelkonzentrat 6,15 %):

Trenngel-Puffer	4,0 ml
Trenngel-Monomer-Gemisch	8,0 ml
Katalysator	16,0 ml
Aqua bidest.	12,0 ml

Probengel-Lösung (Gelkonzentrat 3,15 %):

Probengel-Puffer	1,0 ml
Probengel-Monomer-Gemisch	2,0 ml
Photokatalysator	1,0 ml
Aqua bidest.	4,0 ml

d. Durchführung der Disk-Elektrophorese (nach HILGERMANN)

Die Trenngel-Komponenten wurden in ein Becherglas pipettiert und gemischt. Die Röhrchen wurden bis auf eine Höhe von 10,5 cm gefüllt und mit Aqua dest. überschichtet. Nach 1-stündiger Polymerisation unter einer Tageslicht-Fluoreszenz-Lampe wurde das übergeschichtete Wasser vorsichtig abgesaugt, und es wurden 0,2 ml Probengel-Lösung aufgegeben, die wiederum mit Aqua dest. überschichtet wurde. Nach 30 Minuten unter der Tageslicht-Fluoreszenz-Lampe wurde das Wasser abgesaugt, und es wurden 2 - 4 Tropfen Spurenextrakt aufgegeben. Darauf wurden 0,2 ml Probengel-Lösung geschichtet und 30 Minuten lang polymerisiert (ohne Wasserüberschichtung). Daran schloß sich die Disk-Elektrophorese an. Uns stand ein Gerät mit Plätzen für 8 Röhrchen zur Verfügung. Die Kunststoffröhrchen hatten einen Durchmesser von 6 mm. Die Stromstärke betrug 24 mA (= 3 mA/1 Röhrchen), die Spannung 120 V. Sie mußte während der Elektrophorese nachgestellt werden. Die Gelsäulen wurden nach 4,5 Stunden mit einer Spritze und Wasser herausgelöst, mit einem Tolidin-Eisessig-Perhydrol-Gemisch (s. S. 7) gefärbt und über einem Lichtkasten ausgewertet.

2. Ergebnisse

Es wurden insgesamt 80 Einzelproben elektrophoretisch aufgetrennt. Die Versuche wurden in 4 Modifikationen durchgeführt:

a. Alleinige Anwendung der Disk-Elektrophorese

Das blutspurenhaltige Material wurde mit möglichst wenig 0,04 %iger NH_3-Lösung bedeckt (SCHLEYER und OEPEN). Als Elutionsmittel wurde auch 0,01 m Phosphatpuffer (OYA und TAKABE) verwendet. Mit Phosphatpuffer wurde dann eluiert, wenn im selben Elektrophoreselauf auch Spuren aufgetrennt wurden, die nach den unter b. - d. genannten Methoden aufbereitet

worden waren.
Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten Blutspuren auf Glas mit einem Alter von 16 Tagen eindeutig nachgewiesen werden. Bei 23 Tage alten Spuren zeigten sich nur schwach angedeutete Banden.
Spuren auf Papier ergaben bis zu einem Alter von 16 Tagen Banden. Zu diesem Zeitpunkt waren sie bereits recht schwach dargestellt.

b. Anwendung der Säulenchromatographie vor der Disk-Elektrophorese

Die Spur wurde in der drei- bis fünffachen Menge Phosphatpuffer gelöst und über eine 2 bzw. 3 x 0,5 cm messende, mit P-Cellulose gefüllte Säule geschickt (OYA und TAKABE).
Mit dieser Methode konnte ein Teil des überschüssigen Hämoglobins entfernt werden. Die Länge der Säule kann nach der Menge des vorhandenen Spurenmaterials variiert werden. Das Säulenfüllmaterial wurde bei einem Frischblut-Ausgangsvolumen von 0,10 - 0,20 ml 2 cm, bei mehr 3 cm hoch gepackt.
Wesentliche Vorteile zeigte dieses Verfahren in dieser Form im Vergleich zu dem unter a. beschriebenen nicht. Es führte zu einer Verdünnung des Blutspurenmaterials und somit zu schwächeren Banden.
Spuren mit einem Alter von 10 Tagen konnten wir mit dieser Methode darstellen. Bei älteren Spuren verhinderte die starke Abschwächung der Hp-Banden eine Typendifferenzierung.

c. Anwendung der Säulenchromatographie und der Gefriertrocknung vor der Disk-Elektrophorese

Die Spur wurde, wie unter b. geschildert, in Phosphatpuffer gelöst, und das überschüssige Hämoglobin wurde säulenchromatographisch abgetrennt. Der Extrakt wurde eingefroren und gefriergetrocknet.
Es zeigten sich keine Vorteile gegenüber der unter a. dargestellten Verfahrensweise. Durch die Gefriertrocknung kann es

jedoch zu einer so starken Anreicherung des Hämoglobins bei der Diskelektrophorese kommen, daß die Ablesbarkeit beeinträchtigt ist. Am störendsten machte sich dies beim Typ 1-1 bemerkbar.
Eine Verlängerung der Ablesbarkeit konnte nicht erreicht werden.

d. Anwendung der Gefriertrocknung vor der Disk-Elektrophorese

Die Spur wurde in der ca. fünffachen Menge des Frischblut-Ausgangsvolumens an 0,01 m Phosphatpuffer gelöst. Der Extrakt wurde ohne vorherige Säulenpassage eingefroren und gefriergetrocknet.
Mit diesem Verfahren wurden Ergebnisse wie die unter a. aufgeführten erzielt. Von Vorteil ist es bei geringen (ca. 0,10 ml) und nicht mehr frischen Spurenmengen; diese ließen sich durch die Konzentrierung etwas schärfer darstellen. Bei größeren Spurenmengen besteht auch hier die Möglichkeit zu starker Konzentrierung mit Ausbildung einer Hämoglobinschleppe.
Eine wesentlich längere Darstellbarkeit der Spuren mit dieser Methode hat sich nicht gezeigt.

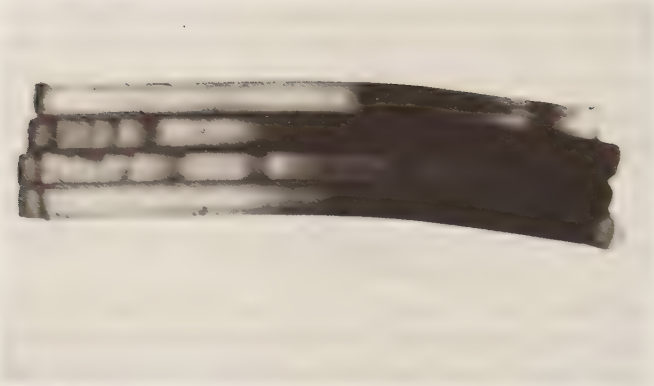

Abb. 18: Nr. 1 = 1-1
Nr. 2 = 2-2
Nr. 3 = 2-1
Nr. 4 = 1-1
Es handelt sich um 0 Tage alte Blutspuren (keine Saulenpassage, keine Gefriertrocknung).

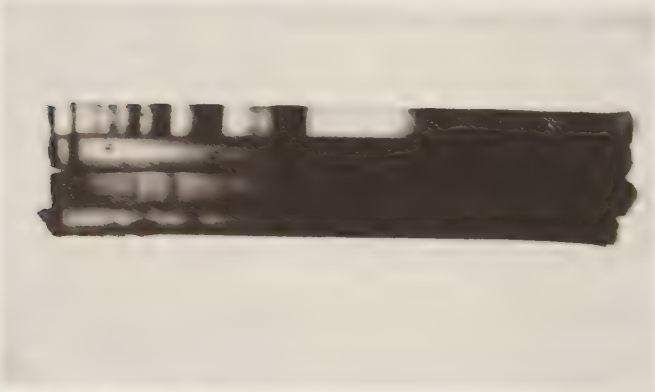

Abb. 19: Nr. 1 = 2-1, Serum
Nr. 2 = 1-1
Nr. 3 = 2-2
Nr. 4 = 2-1
Bei Nr. 2 - 4 handelt es sich um 35 Tage alte Blutspuren (keine Saulenpassage, keine Gefriertrocknung).

Abb. 20: Nr. 1 = 2-1, Passage über eine 2 x 0,5 cm messende Säule, mit Gefriertrocknung.
Nr. 2 = 2-1, keine Säulenpassage, mit Gefriertrocknung.
Nr. 3 = 2-1, Passage über eine 2 x 0,5 cm messende Säule, keine Gefriertrocknung.
Nr. 4 = 2-1, keine Säulenpassage, keine Gefriertrocknung.
Alle Spuren sind 7 Tage alt.

III. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Untersuchungen zum Nachweis der Haptoglobintypen in Blutspuren. Dabei fanden drei verschiedene Techniken Anwendung:

1. Die PAA-Gel-Elektrophorese in der Modifikation nach WALCHER

2. Die Immunelektrophorese im Agargel nach der Arbeitsanleitung von BRINKMANN und STALLBAUM

3. Die Disk-Elektrophorese; hierbei wurde die von HILGERMANN angegebene Verfahrensweise angewendet sowie die von OYA und TAKABE beschriebene Säulenchromatographie zur Elimination des überschüssigen Hämoglobins. Letzteres Verfahren wurde auch bei der PAA-Gel-Elektrophorese verwendet.

Nachdem SMITHIES die Darstellung der Haptoglobintypen im Stärkegel beschrieben hatte, versuchten mehrere Autoren, die Stärkegeltechnik zur Darstellung der Haptoglobine aus Blutspuren zu verwenden (DÜRWALD, VOGEL, FALK und BUNDSCHUH, CULLIFORD, HEIFER, MÜNSCHER).
Es kommt dabei zur Ausbildung von Hämoglobinschleppen, d. h. das überschüssige Hämoglobin führt zu einer flächenhaften Verschmierung der an sich schon schwachen Hämoglobinbanden. Die meisten Autoren geben eine kurze Nachweisbarkeitsdauer von wenigen Tagen an, VOGEL und DÜRWALD gelang die Darstellung von bis zu 3 Monate alten Spuren.
Da die Haptoglobine im Spureneluat stark verdünnt vorliegen, wurden Techniken zu ihrer Anreicherung entwickelt (DÜRWALD, VOGEL, HEIFER). Trotzdem blieb die Haptoglobindarstellung aus Blutspuren mit der Stärkegeltechnik unbefriedigend.

Die PAA-Gel-Elektrophorese wurde in verschiedenen Modifikationen von GERVAIS und VIESCOU, SCHAIBLE, FELIX, BOENISCH und GIESE angewandt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Gele und Puffer nach einer Arbeitsanleitung von WALCHER erstellt.

In Vorversuchen wurden die Blutspuren eluiert, kleine Filterpapierstückchen (4 x 4 mm, Schleicher & Schüll, Nr. 598) wurden in das Eluat getaucht und in Schlitze des Gels gesteckt. Nach der Elektrophorese zeigten sich Hämoglobinschleppen, die ein Erkennen der Haptoglobintypen nicht zuließen.
Bei den folgenden Versuchen wurde im Anschluß an die Elution der Blutspur der Extrakt über eine 7 x 0,5 cm messende, mit P-Cellulose gefüllte Chromatographiesäule laufen gelassen. Das Eluat wurde in einem Reagenzglas aufgefangen, es wurden kleine Filterpapierstückchen eingetaucht und in Schlitze des Gels gesteckt (siehe oben). Bei einem Teil der Versuche wurde das Eluat nach der Säulenpassage eingefroren, gefriergetrocknet, mit wenigen Tropfen Aqua dest. wieder aufgelöst und elektrophoretisch aufgetrennt.
Insgesamt wurden 42 Gele mit 558 Einzelproben untersucht.
Die gefriergetrockneten Eluate frischer Proben zeigten ausreichend gut dargestellte Hp-Banden. Allerdings kommt bei geringfügig zu hoher Hämoglobinkonzentration im Eluat durch die Gefriertrocknung eine so hohe Hb-Anreicherung zustande, daß sich Hb-Schleppen bilden, die die Ablesbarkeit unmöglich machen. Ohne Gefriertrocknung sind die Haptoglobinbanden schwächer, es kommt aber nicht so leicht zu Hb-Schleppen. Allerdings besteht die Gefahr, daß überhaupt zu wenig Haptoglobin vorhanden ist, um erkennbare Banden entstehen zu lassen.
In bezug auf die Dauer der Ablesbarkeit ergaben sich mit und ohne Gefriertrocknung keine Unterschiede; Eluate aus Blutspuren, die älter als 1 Woche waren, ließen sich nicht mehr ablesen.
Die optimale Ausgangsmenge der Blutspuren waren 0,15 - 0,20 ml. Frischblut, das in der fünffachen Menge Phosphatpuffer gelöst wurde. Mit weniger als 0,15 ml war normalerweise kein Hp-Nachweis möglich, größere Mengen als 0,20 ml vergrößerten die Gefahr von Hb-Schleppen.
Die in der Literatur angegebenen, mit anderen Modifikationen der PAA-Gel-Elektrophorese erzielten Nachweiszeiten von 2 Wochen bis zu 1 Monat konnten nicht erreicht werden.

Zum Hp-Nachweis aus Blutspuren mit Hilfe der Immunelektrophorese wurden von HALLERMANN und STÜRNER, CULLIFORD und WRAXALL,

BARGAGNA und BONDI, WHITEHEAD und MORRIS, STALLBAUM, HILGERMANN und FUKAE et al. verschiedene Modifikationen beschrieben. In der vorliegenden Arbeit hielten wir uns an das von BRINKMANN und STALLBAUM angegebene Verfahren (s. S. 15 f.). Dieses wurde dahingehend geändert, daß die Spur nach der Elution analog dem bei der Paa-Gel-Elektrophorese angegebenen Verfahren eingefroren und gefriergetrocknet wurde. Insgesamt wurden 131 Spurenuntersuchungen mit der Immunelektrophorese durchgeführt.
Die Typen 1-1 und 2-1 konnten bei auf Glas aufgebrachten Spuren bis zu einem Alter von 3 Wochen abgelesen werden, der Typ 2-2 nur bis zu einem Alter von 2 Wochen. Auf Papier aufgebrachte Spuren waren jeweils 1 Woche weniger lang identifizierbar. Aus nicht eingeengten Extrakten ließen sich die Hp-Typen ähnlich lange darstellen, aber die Präzipitatlinien waren schwächer. Blutspuren ab 0,1 ml Frischblut-Ausgangsvolumen, gelöst in der dreifachen Menge Gelpuffer, ließen sich darstellen.
Hinsichtlich der Zeitdauer der Nachweisbarkeit stimmen die Ergebnisse etwa mit denen von WHITEHEAD und MORRIS, HILGERMANN, und FUKAE et al. überein.
Die Immunelektrophorese ist ein labortechnisch einfaches und wenig störanfälliges Verfahren, mit dem sich, unter Einbeziehung der Gefriertrocknung, die Haptoglobintypen wochenlang nachweisen lassen. Gegenüber einem Überschuß an freiem Hämoglobin ist die Immunelektrophorese unempfindlich.

Verschiedene Verfahren zur Darstellung der Hp-Typen aus Blutspuren mit der Disk-Elektrophorese wurden von GONZALO et al., HILGERMANN, BAXTER und REES, OYA und TAKABE, und SAGISAKA und SHIMADA beschrieben.
Wir gingen zunächst von dem von OYA und TAKABE angegebenen Verfahren zur Abtrennung des überschüssigen Hämoglobins aus. Die Disk-Elektrophorese wurde nach der Methode von HILGERMANN durchgeführt.

Es wurden folgende 4 Modifikationen angewandt:

a. Lösen der Spur mit möglichst wenig Elutionsmittel (wenige Tropfen); Entnahme von Eluat mit einer Kapillare und Aufgeben auf die Elektrophoreseröhrchen.

b. Nach dem Lösen der Spur in der drei- bis fünffachen Menge des Frischblut-Ausgangsvolumens Aufgeben auf eine 2 bzw. 3 x 0,5 cm messende, mit P-Cellulose gefüllte Chromatographiesäule zur Abtrennung des überschüssigen Hämoglobins (Prinzip nach OYA und TAKABE), anschließend Disk-Elektrophorese.

c. Nach dem Lösen der Spur in der drei- bis fünffachen Menge des Frischblut-Ausgangsvolumens Aufgeben auf eine 2 bzw. 3 x 0,5 cm messende, mit P-Cellulose gefüllte Chromatographiesäule zur Abtrennung des überschüssigen Hämoglobins; anschließend Auffangen des Eluats in einer Portion; Einfrieren; Gefriertrocknung; vor der Disk-Elektrophorese Lösen des Lyophilisats in wenigen Tropfen Aqua dest.

d. Lösen der Spur in der drei- bis fünffachen Menge des Frischblut-Ausgangsvolumens; Einfrieren des Extrakts; Gefriertrocknung; vor der Disk-Elektrophorese Lösen des Lyophilisats in wenigen Tropfen Aqua dest.

Nach diesen Verfahrensweisen wurden 80 Einzelproben elektrophoretisch aufgetrennt.
Spuren auf Glas und Papier mit einem Alter von 16 Tagen konnten bestimmt werden. Auf Glas aufgebrachte, 23 Tage alte Spuren konnten noch nachgewiesen werden; die Banden stellten sich jedoch nur schwach dar.
Weitgehend gleiche Ergebnisse wurden mit den unter a. und c. genannten Verfahrensweisen erzielt. Das unter b. genannte Verfahren brachte keinen Vorteil. Die ausschließliche Anwendung der Gefriertrocknung (d.) zeigte bei geringen Spurenmengen (weniger als 0,1 ml) oder bei nicht mehr frischen Spuren etwas schärfer ausgeprägte Banden. Eine wesentlich verlängerte Nachweisbarkeitsdauer (um Tage) hat sich mit diesem Verfahren nicht erkennen lassen.
Durch das Einfrieren und die Gefriertrocknung tritt keine Schädigung des Haptoglobins auf; eine Entmischung (PROKOP

und UHLENBRUCK) konnte nicht festgestellt werden.
Bei Anwendung der Disk-Elektrophorese läßt sich mit einer vorhergehenden säulenchromatographischen Abtrennung des überschüssigen Hämoglobins mit P-Cellulose keine Verlängerung der Dauer der Darstellbarkeit der Spuren erzielen.
Der Effekt der Säulenchromatographie zur Entfernung des Hämoglobins läßt sich zwar nachweisen (Abb. 1 und 2), für die tatsächliche Verwertbarkeit ergibt sich jedoch kein wesentlicher Vorteil.
Die Anwendung der Gefriertrocknung ist bei alten und geringen Spuren günstig, da diese mit reichlich Flüssigkeit aus dem Spurenträger eluiert werden können und der Extrakt anschließend auf schonende Weise eingeengt werden kann.
Die Säulenchromatographie ist bei der PAA-Gel-Elektrophorese von Vorteil, sie ermöglicht eine relativ gute Darstellbarkeit der Hp-Typen.
Obwohl die Disk-Elektrophorese labortechnisch aufwendiger ist, ist ihr gegenüber der kontinuierlichen PAA-Gel-Elektrophorese der Vorzug zu geben wegen der wesentlich längeren und deutlicheren Darstellbarkeit der Haptoglobintypen. Die der Disk-Elektrophorese vorgeschaltete Entfernung des überschüssigen Hämoglobins durch Säulenchromatographie verbessert dieses Verfahren nicht wesentlich.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde mit drei verschiedenen Elektrophoreseverfahren versucht, die Haptoglobintypen aus auf Filterpapier und Glas angelegten Blutspuren darzustellen:

Folgende drei Elektrophoreseverfahren wurden verwendet:
1. Die PAA-Gel-Elektrophorese in Gelblöcken
2. Die Immunelektrophorese im Agargel
3. Die Disk-Elektrophorese

Vor der PAA-Gel- und der Disk-Elektrophorese wurde durch Säulenchromatographie mit P-Cellulose versucht, überschüssiges Hämoglobin von der eluierten Blutspur zu entfernen. Der Effekt der Säulenchromatographie läßt sich spektrophotometrisch nachweisen; während der Gesamt-Protein-Gehalt des Eluats gleich bleibt, nimmt der Hb-Gehalt um mehr als 2/3 ab.
In der kontinuierlichen PAA-Gel-Elektrophorese kommt es dadurch zu einer geringeren Ausbildung von Hb-Schleppen. Das Eluat kann durch Gefriertrocknung eingeengt werden. Hp-Spuren können so maximal 1 Woche lang nachgewiesen werden.

In der Immunelektrophorese waren auf Glas aufgebrachte Spuren bis zu 23 Tagen nachweisbar, Spuren auf Papier etwa eine Woche weniger lang. Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Eluat durch Gefriertrocknung eingeengt. Durch das Einfrieren und die Gefriertrocknung erleiden die Haptoglobine keinen Schaden. In der Immunelektrophorese ergeben sich kräftigere Präzipitate.

Mit der Disk-Elektrophorese können Hp-Spuren bis zu einem Alter von 16 Tagen gut und bis zu einem Alter von 23 Tagen mit schwachen Banden dargestellt werden. Hier bringt die Säulenchromatographie keinen wesentlichen Vorteil. Mit der Gefriertrocknung stellen sich bei alten Spuren oder geringen Spurenmengen etwas schärfere Banden dar.

Herrn Prof. Dr. Schwerd danke ich für die Überlassung des Themas und für die jederzeit freundlich gewährte Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

LITERATURVERZEICHNIS

BARGAGNA M.
BONDI G. C.
La determinazione del tipo aptoglobinico su macchie di sangue mediante immunoelettroforesi.
Min. medicoleg. 88, 1968, S. 183-186

BAXTER S. J.
REES B.
Simultaneous Haptoglobin and Haemoglobin Typing of Blood and Bloodstains Using Gradient Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
Med. Sci. Law 14, 1974, S. 231-236

BLAICH R.
Analytische Elektrophoreseverfahren.
Thieme-Verlag, Stuttgart 1978

BRINKMANN B.
Eine immunelektrophoretische Methode zur Differenzierung der Haptoglobintypen.
Diss. Hamburg 1965

BRINKMANN B.
STALLBAUM V.
Immunelektrophoretische Bestimmung der Haptoglobintypen aus Seren, alten Blutproben und Blutspuren.
Festschrift für Prof. Fritz,
Hamburg 1969

CASTILLA J.
VILLANUEVA E.
GISBERT-CALABUIG J.-A.
Investigation des types haptoglobiniques par électrophorèse verticale en gel d' acrylamide en disques.
Application au diagnostic des taches de sang.
Méd. lég. et dommage corp. 5, 1972,
S. 52-54

CULLIFORD B.
Haptoglobines and Transferrins in Forensic Bloodstains.
Nature 198, 1963, S. 796-797

CULLIFORD B.
WRAXALL B. G. D.
Haptoglobin Types in Dried Bloodstains.
Nature 211, 1966, S. 872-873

DAVIS B.
Discelectrophoresis II.
Method and Applications to Human Serum Proteins.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 1964, S. 404--427

DILLMANN G.
Untersuchungen zur Bestimmung der ABH-Antigene sowie MN- und Rh-Faktoren in eingetrockneten und verunreinigten Blutspuren.
Diss. Erlangen-Nürnberg 1966

DÜRWALD W.
Haptoglobinnachweis in Blutflecken.
Act. Med. leg. soc. 16, 1963, S. 67-71

FALK H.
BUNDSCHUH G.
Haptoglobine in Blutspuren.
Act. Med. leg. soc. 16, 1963, S. 63-65

FELIX R. T.
BOENISCH T.
GIESE R. W.
Haptoglobin Phenotyping of Bloodstains by Nongradient Polyacrylamide Electrophoresis.
J. Forensic Sci. 22 (3), 1977, S. 580--585

FUKAE T.
IMAI T.
OHYA J.
SUJAMA H.
Determination of Serum Gc and Hp Types from Bloodstains.
Act. crim. Japon. 41 (1), 1975, S. 5-10

GERVAIS P.
VIESCOU C.
FOURNIER E.
GAULTIER M.
DEROBERT L.
Gel d'acrylamide et médicine légale.
Ann. méd. lég. 47, 1967, S. 362-371

GERVAIS P.
VIESCOU C.
Les possibilités de l'électrophorèse en gel d'acrylamide pour l'identification des taches de sang par les groupes d'haptoglobines.
Ann. méd. lég. 45, 1965, S. 244-247

GONZALO J. C.
VILLANUEVA E.
GISBERT-CALABUIG J. A.
Aplicación de los grupos plasmáticos Hp a la resolución de dos casos de individualización medico-legal de manchos de sangre mediante electrophoresis en gel de poliacrilamida "en disco".
Zacchia 46, 1971, S. 502-515

HALLERMANN W.
STÜRNER K.
Untersuchungen über die Möglichkeit des Nachweises der Haptoglobintypen in experimentell bereiteten Blutspuren auf Stoffstücken.
41. Kongr. Ges. gerichtl. Med. Münster 1962
Zit. nach MÜNSCHER

HEIFER U.
Untersuchungen über das Haptoglobin und Methämalbumin in Blut, Blutspuren und Sperma mittels Stärkegel-Elektrophorese.
Blut 10, 1964, S. 113-119

HILGERMANN R.
Haptoglobintypenbestimmung mittels vertikaler Säulenelektrophorese in Polyacrylamidgel.
Z. Rechtsmed. 70, 1972, S. 16-24

HILGERMANN R. Vergleichende Untersuchungen zur Empfindlichkeit der Haptoglobintypenbestimmung in verschiedenen Medien unter besonderer Berücksichtigung gealterter Blutproben und von Blutspuren.
Z. Rechtsmed. 71, 1972, S. 222-234

HIRSCHFELD J. Immune-Electrophoretic Demonstration of Qualitative Differences in Human Sera and their Relation to the Haptoglobins.
Acta path. et microbiol. scandinav. 47, 1959, S. 160-168
Zit. nach BRINKMANN und STALLBAUM

HIRSCHFELD J. Characterization of Precipitating Components in Normal Human Sera Obtained by an Immuno-Electrophoretic Technique.
Acta path. et microbiol. scandinav. 49, 1960, S. 255
Zit. nach BRINKMANN und STALLBAUM

MÜNSCHER F. Blindversuche zur ABO-, MN-, Hp- und Gm-Bestimmung in Blutflecken.
Diss. Marburg 1967

OKUTSU M. Fundamental Studies on the Difference of Absorbing Capacity in Titer of Various Antisera in the Group Determinations of Human Blood and Saliva Stains, and on the Differentiation to Haptoglobin Type of Human Bloodstains.
J. Tokyo Med. Coll. 28 (1), 1970, S. 13--29

ORNSTEIN L. Discelectrophoresis I.
Background and Theory.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 1964, S. 321--349

OYA M.
TAKABE F.
Eine verbesserte Methode zur Darstellung der Haptoglobintypen aus Blutspuren.
Z. Rechtsmed. 77, 1976, S. 105-107

POLONOVSKI M.
JAYLE M.-F.
Existence dans le plasma humain d'une substance activant l'action peroxydasique de l'hemoglobine.
C. R. Soc. Biol. 129, 1938, S. 457
Zit. nach JAYLE M.-F.
Les haptoglobines.
Masson & Cie., Paris 1962

PROKOP O.
UHLENBRUCK G.
Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen.
Edition Leipzig, Leipzig 1963

PROKOP O.
BUNDSCHUH G.
Die Technik und die Bedeutung der Haptoglobine und Gm-Gruppen in Klinik und Gerichtsmedizin.
Walter de Gruyter & Co, Berlin 1963

PROKOP O.
GÖHLER W.
Forensische Medizin.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 1976

RICHTERICH R.
Klinische Chemie.
S. Karger Verlag, Basel 1971

SAGISAKA K.
SHIMADA H.
A Device for Haptoglobin Typing of Bloodstains.
Act. Crim. Japon. 43 (1), 1977, S. 15-18

SCHAIBLE P.
Versuche zur Darstellung der Haptoglobintypen durch Acrylamidgel-Elektrophorese.
Diss. Marburg 1967

SCHLEYER F.
SCHAIBLE P.
Darstellung der Haptoglobintypen durch Elektrophorese in Polyacrylamidgel.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 1, 1967, S. 32-34

SCHLEYER F.
OEPEN J.
Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspurenuntersuchungen.
Verlag Max Schmidt-Römhild, Lübeck 1977

SMITHIES O.
Zone Electrophoresis in Starch Gels: Group Variations in the Serum Proteins of Normal Human Adults.
Biochem. J. 61, 1955, S. 629-641
Zit. nach PROKOP und GÖHLER

SMITHIES O.
WALKER N. F.
Genetic Control of Some Serum Proteins in Normal Humans.
Nature 175, 1955, S. 1265
Zit. nach PROKOP und GÖHLER

STALLBAUM V.
Über den immunelektrophoretischen Nachweis von Haptoglobinen aus Blutspuren und gelagerten hämolytischen Blutproben.
Diss. Hamburg 1970

VILLANUEVA E.
TRAN VAN KY PH.
LENOIR L.
DEMAILLY X.
MÜLLER P.
Etude des haptoglobines humaines par électrophorèse en gel de polyacrylamide à gradient de densité continue.
Méd. lég. et dommage corp. 5, 1972, S. 48-51

VILLANUEVA E.
CASTILLA J.
GISBERT-CALABUIG J.-A.
RUBIN DE CELIS G.
Etude de la dégradation de certaines protéines (Albumine, Transferrine, Haptoglobine et Immunglobuline IgG) dans le processus de vieillissement des taches de sang.
Méd. lég. et dommage corp. 5, 1972, S. 63-67

VOGEL G. — Untersuchung von Blutspurenmaterial. Kriminalistik 16, 1962, S. 439-442

WALCHER A. — Persönliche Mitteilung an Herrn Prof. Schwerd.

WHITEHEAD P. H.
MORRIS P. A. — Improved Technique for the Typing of Haptoglobins in Bloodstains. J. Forens. Sci. Soc. 9, 1969, S. 129--130

LEBENSLAUF

Am 18. September 1950 wurde ich als Sohn des jetzigen Studiendirektors Kilian Staudinger und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Staudinger, in Passau geboren. Ich besuchte von 1956 bis 1960 die Volksschule in Vilshofen und von 1960 bis 1964 das Gymnasium in Vilshofen. Dann wechselte ich auf den neusprachlichen Zweig des Adalbert-Stifter-Gymnasiums Passau über, wo ich 1969 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1969/70 studierte ich an der Universität Regensburg Germanistik und Geschichte. Zum Sommersemester 1970 erhielt ich die Zulassung zum Medizinstudium an der Universität Würzburg, wo ich 1972 die Ärztliche Vorprüfung ablegte. Das Sommersemester 1973 verbrachte ich am Klinikum rechts der Isar der TU München. Anschließend setzte ich das Medizinstudium in Würzburg fort und schloß es im Herbst 1975 mit dem Staatsexamen ab.

Den internen Teil der Medizinalassistentenzeit verbrachte ich an der Hartwald-Klinik Bad Brückenau, den chirurgischen Teil am Kreiskrankenhaus Tauberbischofsheim; danach war ich ein Jahr als Medizinalassistent und Assistenzarzt an der geburtshilflich-gynäkologischen Abteilung des Krankenhauses St. Josef in Schweinfurt tätig. Im April 1978 wurde ich zur Bundeswehr eingezogen. Von August 1978 bis November 1979 war ich am Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg beschäftigt, von Dezember 1979 bis Dezember 1980 an der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Gerolzhofen. Seit Januar 1981 setze ich die Weiterbildung zum Arzt für Allgemeinmedizin an der inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Ochsenfurt fort.

Im Mai 1976 heiratete ich die Medizinstudentin Angelika Scholler. Wir haben einen Sohn.

Roman Staudinger